

PRODUCTION OF HYDROXYALKANOIC ACID COPOLYMER

Patent number: JP9191893
Publication date: 1997-07-29
Inventor: SAITO YUJI; TOMOSAWA TAKASHI; TAKEBE HIDEAKI; HIRUTA OSAMU
Applicant: TAISEI CORP; MEIJI SEIKA KAISHA
Classification:
- **international:** C08G63/06; C12P7/62; C08G63/00; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/62; C08G63/06; C12P7/62; C12R1/01
- **european:**
Application number: JP19960008577 19960122
Priority number(s): JP19960008577 19960122

[Report a data error here](#)

Abstract of JP9191893

PROBLEM TO BE SOLVED: To effectively obtain the subject polymer having biodegradability by extracting the wet cells of a microorganism producing a copolymer comprising 3-hydroxybutyrate units and 4-hydroxybutyrate units with acetone containing a surfactant under heating. **SOLUTION:** This method for producing a hydroxyalkanoic acid copolymer comprises culturing a microorganism (e.g. Comamonans acidovorans IFO 13852) having an ability to produce the hydroxyalkanoic acid copolymer comprising 3-hydroxybutyrate units of formula I and 4-hydroxybutyrate units of formula II, centrifuging the cultured solution, and subsequently mixing the recovered wet cells with acetone containing a surfactant under heating to extract the hydroxyalkanoic acid copolymer accumulated in the recovered cells. Thus, the objective hydroxyalkanoic acid copolymer provided with a larger dynamic strength than those of general purpose polymers such as polyethylene or nylon and with excellent biodegradability is obtained.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

This Page Blank (useless)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-191893

(13)公開日 平成9年(1997)7月29日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 P 7/62

C 08 G 63/06

// (C 12 P 7/62

C 12 R 1:01)

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 P 7/62

C 08 G 63/06

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

N L Q

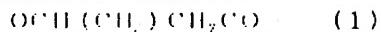
N L Q

N L Q

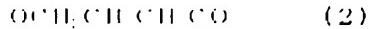
N L Q

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(1) :



で表される3-ヒドロキシブチレート単位と、下記式(2) :



で表される4-ヒドロキシブチレート単位とからなるヒドロキシアルカン酸共重合体生産能を有する微生物の菌体内に蓄積された前記ヒドロキシアルカン酸共重合体を抽出・分離する工程を含む前記ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法において、

前記ヒドロキシアルカン酸共重合体の抽出を、前記菌体の湿菌体に界面活性剤含有アセトンを混合し、加熱することにより行なことを特徴とする、ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法。

【請求項2】 微生物がコマモナス(*Comamonas*)属に属する微生物である、請求項1に記載のヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法。

【請求項3】 界面活性剤が陰イオン又は非イオン界面活性剤である、請求項1又は2に記載のヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法。

【請求項4】 湿菌体に界面活性剤含有アセトンを混合し、加熱した後、菌体残渣を除去し、次いで残ったアセトン溶液を貧溶媒と混合してヒドロキシアルカン酸共重合体を析出させて分離することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法。

【請求項5】 貧溶媒が、メタノールスはヘキサンであることを特徴とする、請求項4に記載のヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法。

【請求項6】 菌体内に蓄積される前記ヒドロキシアルカン酸共重合体が、3-ヒドロキシブチレート単位含量が高い共重合体と4-ヒドロキシブチレート単位含量が高い共重合体とを含む場合に、3-ヒドロキシブチレート単位含量が高い共重合体を選択的に抽出する、請求項1～5のいずれか1項に記載のヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生分解性の3-ヒドロキシブチレート単位（以下、3HB成分という。）と4-ヒドロキシブチレート単位（以下、4HB成分という。）とかなるヒドロキシアルカン酸共重合体（以下、P(3HB-co-4HB)という。）を、微生物を用いて効率よく製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】多くの微生物は、3-ヒドロキシ酪酸（3HB）の小モリエスチルをエネルギー貯蔵物質として蓄積する。さらに近年では、用いる微生物や炭素源の種類に応じて、3-ヒドロキシ酪酸と、3-ヒドロキ

シプロピオニ酸（3HP）や4-ヒドロキシ酪酸（4H）などの他のヒドロキシアルカン酸とがランダムに共重合したヒドロキシアルカン酸共重合体の発酵合成も確認されている。これらの共重合体は、その共重合組成に応じて多様な性質を示すことから、微生物によって分解可能である、生分解性プラスチック材料として大いに注目されている。特に、4HB成分含量の高いP(3HB-co-4HB)は、ポリエチレンやナイロンなどの汎用ポリマー以上の力学的強度と、優れた生分解性を兼ね備えていることから、環境に調和したプラスチック素材として期待されている。

【0003】ところで、微生物を用いてヒドロキシアルカン酸重合体又は共重合体を製造する場合、これらの重合体又は共重合体はエネルギー貯蔵物質として微生物体内に蓄積されるため、菌体から分離・精製するための工程が必要となる。

【0004】菌体内からの代表的な分離・精製方法としては、例えば、ヒドロキシアルカン酸重合体及び、又は共重合体が蓄積された微生物の菌体を乾燥し、乾燥菌体からクロロホルムや塩化メチレンなどのハロゲン系有機溶剤を用いて前記重合体及び、又は共重合体を抽出した後、抽出液をメタノールやヘキサンなどの貧溶媒と混合することによって前記重合体及び、又は共重合体を析出させて回収する方法（第1の方法）、ヒドロキシアルカン酸重合体及び、又は共重合体が蓄積された微生物の細胞質をプロテアーゼで溶解させ、界面活性剤を用いて当該重合体及び、又は共重合体を精製する方法（第2の方法）が挙げられる。

【0005】しかしながら、上記第1の方法は、高純度かつ高収率でヒドロキシアルカン酸重合体及び、又は共重合体の分離・精製が可能であるが、菌体を乾燥させる工程が必要であるため効率が悪く、さらに環境規制に関わるハロゲン系有機溶剤を使用することなどの問題がある。また、第2の方法では、抽出方法として細胞質分解酵素であるプロテアーゼを用いるために高価であり、実用化には問題がある。

【0006】一方、用いる微生物の種類や培養条件によっては、3HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)と、4HB成分の含量が高いP(3HB-co-4HB)とを同時に蓄積することがある。このような場合、従来の方法では、3HB成分の含量が高いP(3HB-co-4HB)と4HB成分の含量が高いP(3HB-co-4HB)とが混合した状態で一緒に抽出されるので、どちらか一方を得るためにそれぞれを分離するための精製工程が必要となるという問題もある。

【0007】

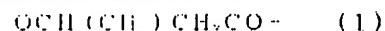
【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の課題は、環境規制に関わるハロゲン系有機溶剤を用いずに、効率よく経済的に3HB成分と4HB成分とかなるヒドロキシアルカン酸共重合体（以下、P(3HB-

o-4 HB) という。) を微生物を用いて製造する方法を提供することにある。特に、本発明は、微生物菌体内に 3 HB 成分含量が高い P (3 HB-co-4 HB) と、4 HB 成分含量が高い P (3 HB-co-4 HB) が蓄積される場合に、4 HB 成分含量が高い P (3 HB-co-4 HB) (通常、4 HB 成分含量が 60 モル % 以上のもの) を該菌体から選択的に抽出することが可能なヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法を提供することを課題とする。

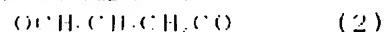
【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、下記式 (1) :



で表される 3 -ヒドロキシブチレート単位 (3 HB 成分) と、下記式 (2) :



で表される 4 -ヒドロキシブチレート単位 (4 HB 成分) とからなるヒドロキシアルカン酸共重合体 (P (3 HB-co-4 HB)) 生産能を有する微生物の菌体内に蓄積された前記ヒドロキシアルカン酸共重合体を抽出・分離する工程を含む前記ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法において、前記ヒドロキシアルカン酸共重合体の抽出を、前記菌体の湿菌体に界面活性剤含有アセトンを混合し、加熱することにより行うことを特徴とする、ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法を提供するものである。

【0009】本発明においては、微生物菌体内に蓄積された上記 P (3 HB-co-4 HB) の抽出を、界面活性剤を含有するアセトンと混合して加熱することにより行う。この場合、湿菌体をそのまま界面活性剤含有アセトンに混合すればよいので菌体を乾燥する必要がなく、生産性、経済性に優れる。また、湿菌体と界面活性剤含有アセトンとを混合して加熱する際の加熱温度はアセトンの沸点程度又はそれ以上であれば問題はなく、好ましくは 50~60 ℃ である。加熱温度が低すぎると抽出効率及び抽出速度が低下する。更に、抽出時間は、通常 3~10 時間程度である。

【0010】界面活性剤の種類は特に限定されず、具体的には、N-アシルアミノ酢酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルケンスルホン酸塩、脂肪酸塩、硫酸エステル塩、硫酸アルキルフェニルポリオキシエチレン塩、硫酸アルキルポリオキシエチレン塩、リン酸アルキルポリオキシエチレン塩等の陰イオン界面活性剤；アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル、アルキルポリオキシエチレンエーテル、脂肪酸ポリオキシエチレンエステル、Tween 系界面活性剤 (ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン、N-ヒドロキシエチルアルカンアミド等の非イオン界面活性剤；1-(2-アシルアミノエチル)-1-メチル-2-アルキルイミダゾリニウム塩、アルキルトリメチルアンモニウム塩、アルキ

ルビリジニウム塩、アルキルベンジルジメチルアンモニウム塩、アルキルメチルジポリエトキシアンモニウム塩等の陽イオン界面活性剤；N-アルキルアミノ酸、N-アルキルジメチルアミノ酸、アルキルジメチルアミノキシド等の両性界面活性剤が例示され、これらの中で好ましいのは陰イオン界面活性剤及び非イオン界面活性剤であり、更に好ましいのは Tween 80 及びドデシル硫酸ナトリウムである。

【0011】また、アセトン中の界面活性剤の配合量は、0.05~0.5 重量 % の範囲が好ましい。界面活性剤の配合量が高すぎると抽出した P (3 HB-co-4 HB) に界面活性剤が混在するとともに P (3 HB-co-4 HB) の分子量の低下を招き、界面活性剤の配合量が低すぎると抽出効率が低下する。

【0012】菌体から上記 P (3 HB-co-4 HB) を抽出した後、P (3 HB-co-4 HB) を回収するには、従来公知の方法で行うことができる。具体的には、上記菌体とアセトンの混合液から菌体残渣を沪過又は遠心分離により除去し、次いで残ったアセトン溶液を食塩水と混合して P (3 HB-co-4 HB) を析出させることによって P (3 HB-co-4 HB) を回収することができる。食塩水の種類は特に限定されず、具体的にはメタノール、ヘキサン、ベンタン、水等が例示され、好ましいのはメタノール及びヘキサンである。

【0013】本発明で用いる微生物は、P (3 HB-co-4 HB) 生産能を有する微生物であればいいもののどちらよい。例えば、コマモナス (comamonas) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属等に属するものであって、P (3 HB-co-4 HB) 生産能を有する微生物が挙げられる。具体的には、コマモナス アシドボランズ (Comamonas acidovorans)、アルカリゲネス ユートロファス (Alcaligenes eutrophus)、アルカリゲネス ラタス (Alcaligenes latus) 等がある。入手容易な菌株としては、コマモナス アシドボランズ JFO13852、アルカリゲネス ユートロファス ATCC 17699、アルカリゲネス ユートロファス ATCC 11599、アルカリゲネス ラタス ATCC 29713、ロドコッカス sp. NCIMB 40126、ロドコッカス sp. ATCC 19076 等がある。

【0014】上記のような微生物の菌体内に P (3 HB-co-4 HB) を蓄積させるには、微生物をその微生物の種類に応じた適当な培地に接種して、常法にしたがって培養して増殖させればよい。培地としては、公知のものをいずれも使用できるが、コマモナス属に属する微生物を用いる場合、炭素源としては、3 -ヒドロキシ酸及び 4 -ヒドロキシ酸を使用する。他の炭素源として、炭素原子数が偶数のアルカンジオール、アブチロクタン、4-アミノ酸等が例示される。その他、培地の pH、培養温度、培養時間等の培養条件も微生物の種類により適宜設定する。

【0015】

【実施例】以上、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。尚、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1～4】各実施例において、以下のようにしてP(3HB-co-4HB)を製造した。コマモナス・アシドボランズ(*C. ammonas acidovorans*) IF013852を、肉エキス(1g/L)、ポリペプトン(10g/L)、及び塩化ナトリウム(0.5g/L)を含む天然培地で24時間好気的に培養し増殖させて、次いで、菌体を遠心分離で回収した。続いて、下記の組成の炭素制限のミネラル培地に、炭素源として3-ヒドロキシ酸(3HB)及び4-ヒドロキシ酸(4HB)を表1に示す割合でそれぞれ配合し、回収した菌体を懸濁して48時間培養した。

【0016】炭素制限のミネラル培地組成

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.16 g/L
KH ₂ PO ₄	2.65 g/L
微量元素溶液①	1 mL/L

(1) 微量元素溶液組成(1N-HCl中)

FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78 g/L
--------------------------------------	----------

MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.98 g/L
CoSO ₄ ·7H ₂ O	2.81 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.67 g/L
AlCl ₃ ·2H ₂ O	0.17 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29 g/L

【0017】培養終了後、各培地から得た菌体を凍結乾燥した。培地1L当たりの乾燥菌体重量(g/L)を表1に示す。次いで、乾燥菌体を熱クロロホルムと混合して該菌体からポリマーを抽出した後、ヘキサンを添加した。析出したポリマーの乾燥菌体重量中の含量(重量%)を表1に示す。また、各ポリマーをメチルエステル化してガスクロマトグラフィーにて分析した。各ポリマーの3HB成分含量と4HB成分含量を表1に示す。その結果、実施例1～4では、表1に示すようにそれぞれ4HB含量が56モル%、73モル%、80モル%及び83モル%のP(3HB-co-4HB)が得られ、実施例5では、ホリ-4-ヒドロキシプロピレートが得られたことが確認された。

【0018】

【表1】

実施例	炭素源(g/L)		乾燥菌体重量(g/L)	ポリマー含量		組成(モル%)
	3HB	4HB		(重量%)	3HB成分	
実施例1	2.0	8.0	3.4	27	44	56
実施例2	1.5	8.5	3.5	26	27	73
実施例3	1.0	9.0	3.2	24	20	80
実施例4	0.5	9.5	3.3	23	17	83
実施例5	0	10.0	2.6	17	0	100

3HB:3ヒドロキシ酸、4HB:4ヒドロキシ酸

【0019】実施例6～9】上記実施例1～1で得られた4種類のP(3HB-co-4HB)をそれぞれアセトンに混合し、4°Cで3時間加熱した後、遠心分離を行うことによって熱アセトンに可溶なポリマーと不溶なポリマーとに分別した。熱アセトン混合前のポリマーに対する熱アセトン可溶ポリマーと、熱アセトン不溶ポリマーの割合(重量%)を表2に示す。各実施例とも、P(3HB-co-4HB)は熱アセトンに可溶なポリマーと不溶なポリマーとに分けられ、可溶ポリマーと不溶ポリマー

の共重合組成をそれぞれメチルエステル化してガスクロマトグラフィーにて分析した。各ポリマーの3HB成分含量(モル%)と4HB成分含量(モル%)を表2に示す。この結果から、可溶ポリマーはすべて4HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)であり、不溶ポリマーは3HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)であることが確認された。

【0020】

【表2】

3HB:3ヒドロキシ酸、4HB:4ヒドロキシ酸

実施例No.	ポリマー	割合	組成(モル%)		
			(重量%)	3HB成分	4HB成分
実施例6	実施例1で得られたP(3HB-co-4HB)	可溶ポリマー	9.2	3.6	6.4
		不溶ポリマー	8	7.1	2.9
実施例7	実施例2で得られたP(3HB-co-7.9%4HB)	可溶ポリマー	9.1	2.2	7.8
		不溶ポリマー	9	8.1	1.9
実施例8	実施例3で得られたP(3HB-co-8.0%4HB)	可溶ポリマー	8.8	1.8	8.2
		不溶ポリマー	1.2	6.8	3.2
実施例9	実施例4で得られたP(3HB-co-8.9%4HB)	可溶ポリマー	9.0	1.0	9.0
		不溶ポリマー	1.0	8.2	1.8

【0021】これらの実施例から、微生物によるP(3HB-co-4HB)の合成では、3HB成分含量が高いものと、4HB成分含量が高いものの2種類の共重合体が混合して得られる可能性があることがわかった。また、熱アセトンを用いることによって、4HB成分含量の高いP(3HB-co-4HB)を選択的に分離できることがわかった。

【0022】実施例10~13)実施例6~9)で得られた熱アセトン可溶ポリマーを¹³C-NMRで解析した。40

MHz ¹³C-NMRにおけるカルボニル連鎖の相対ピーク面積から決定したダイアド連鎖のモル分率F₁₃、F₃₄、F₄₃、及びF₄₄を表3に示す。また、熱アセトン可溶ポリマー中の3HB成分と4HB成分のダイアド連鎖のモル分率から、モノマー反応比の積であるD値を下記式により算出した結果も表3に示す。

$$D = (F_{13} \cdot F_{44}) / (F_{34} \cdot F_{43})$$

【0023】

【表3】

実施例No.	ポリマー	ダイアド連鎖のモル分率 ^{a)}				D _{算出}
		F ₁₃	F ₃₄	F ₄₃	F ₄₄	
実施例10	実施例6の可溶ポリマー	0.14	0.18	0.18	0.50	2.2
実施例11	実施例7の可溶ポリマー	0.06	0.15	0.16	0.63	1.6
実施例12	実施例8の可溶ポリマー	0.03	0.13	0.14	0.70	1.2
実施例13	実施例9の可溶ポリマー	0.01	0.08	0.08	0.83	1.3

a) 400MHz ¹³C-NMRにおけるカルボニル連鎖の相対ピーク面積から決定

b) モノマー反応比の積(D=F₁₃・F₄₄/F₃₄・F₄₃)

【0024】これらの結果から、各ポリマーともD値が1に極めて近いことが確認された。これは、統計的に3HB成分と4HB成分とがランダムに共重合していることを示しており(例えば、Yuji Saito and Yoshiharu Dohi, Int. J. Polym. Macromol., 16, 99-104 (1994)参照)、熱アセトン可溶ポリマーはP(3HB-co-4HB)ランダム共重合体であることが確認された。

【0025】実施例14~22、比較例1~4)実施例1にしたがって、4HB成分含量が84モル%のP(3HB-co-4HB)を乾燥菌体重量当たり21重量%の含量で蓄積した菌体を得た。各実施例及び比較例において、表4に示した界面活性剤、即ちTween 80(非イオン系界面活性剤)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム、陰イオン系界面活性剤)、又はCTAB(臭化セチルトリメチルア

ンモニウム、陽イオン系界面活性剤)をそれぞれ0.1重量%配合した300mlの抽出溶媒(表4参照)に、前記菌体(培養液300mlから遠心分離で得た湿菌体)を懸濁させた。得られた菌体懸濁液を、60°Cに調整したウォーターバス内に浸してマグネットミキサーで搅拌したう時間後、菌体懸濁液をPTFE製のメンブランフィルターで吸引通過し、得られた各アセトン溶液の100mlを、それぞれ表4に示した析出溶媒100mlに混合し、ポリマーを析出させた。

【0026】抽出前に菌体に含まれていたポリマーに対する抽出ポリマーの回収率(重量%)を表1に示す。また、得られたポリマーの純度、組成(3HB成分含量(モル%)及び4HB成分含量(モル%))、数平均分子量、並びに多分散度を表4に示す。尚、表中の比較例

1は乾燥菌体から熱クロロホルムで抽出した結果を示し、比較例2から4は湿菌体から界面活性剤を含まないアセトンを用いて抽出した結果を示している。

【0027】

【表4】

実施例番号	抽出溶媒	界面活性剤	析出溶媒	回収率(重量%)	純度(重量%)	組成(モル%)		数平均分子量	多分散度
						3HB成分	4HB成分		
実施例1-4	アセトン	SDS ^{a)}	蒸留水	30	70	4	96	9800	9.7
実施例1-5	アセトン	SDS ^{b)}	メタノール	58	100	4	96	207000	4.9
実施例1-6	アセトン	SDS ^{c)}	ヘキサン	45	94	5	95	154000	6.0
実施例1-7	アセトン	Tween 80	蒸留水	10	100	5	95	102000	8.4
実施例1-8	アセトン	Tween 80	メタノール	57	100	4	96	172000	5.0
実施例1-9	アセトン	Tween 80	ヘキサン	56	100	4	96	138000	6.6
実施例2-0	アセトン	CTAB ^{a)}	蒸留水	82	63	4	96	97000	9.6
実施例2-1	アセトン	CTAB ^{b)}	メタノール	42	74	4	96	214000	5.0
実施例2-2	アセトン	CTAB ^{c)}	ヘキサン	36	70	6	94	208000	5.2
比較例1 ^{a)}	クロロホルム	—	ヘキサン	100	100	4	66	214000	9.8
比較例2	アセトン	—	蒸留水	5	72	4	96	98000	9.7
比較例3	アセトン	—	メタノール	8	98	4	96	196000	5.2
比較例4	アセトン	—	ヘキサン	7	99	4	96	182000	7.2

a) 乾燥菌体から熱クロロホルムによって抽出

b) メチル硫酸ナトリウム

c) 羟化セチルトリメチルアンモニウム

【0028】共重合体の回収率は、アセトンに配合する界面活性剤と析出に用いる貧溶媒の種類によって異なった。ただし、回収した共重合体の純度をみると、界面活性剤としてSDS又はTween 80を用いた条件で抽出し、メタノール又はヘキサンに析出させた場合に高純度の共重合体が得られる結果となった。また、各条件で抽出した共重合体の分子量をみると、すべての条件とも析出される貧溶媒として、メタノール \rightarrow ヘキサン \rightarrow 蒸留水の順序で高くなることがわかった。さらに、多分散度をみると、メタノールに析出させた共重合体は、他の条件よりも狭くなることがわかった。

【0029】

【発明の効果】本発明のP(3HB-co-4HB)の製造方法によれば、湿菌体からP(3HB-co-4HB)を抽

出することができるため菌体の乾燥を行なう必要がなく、しかも抽出時間も短縮することができるので、製造工程の効率化を図ることができる。更に、この上うな製造工程の効率化によりエネルギー消費量を低減することができ、経済性に優れる。また、菌体からのP(3HB-co-4HB)の抽出溶媒に用いるアセトンは回収・再利用が可能であり、抽出温度も通常50~60°C程度であることから、省エネルギーで安全に抽出することができる。更に、本発明によれば、菌体に3HB成分含量の高いP(3HB-co-4HB)と4HB成分の含量の高いP(3HB-co-4HB)（通常、4HB成分含量が60モル%以上のもの）とが密積されている場合に、4HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)を容易に精度よく選択的に分離・精製することができる。

フリントペー(1)の続き

(72)発明者 武部 英日

神奈川県小田原市柏山788 明治製薬株式
会社薬品技術研究所内

(72)発明者 蛭田 修

神奈川県小田原市柏山788 明治製薬株式
会社薬品技術研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



BLACK BORDERS

- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Block (Page 1)